AUS DEM HYGIENISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT BASEL
(VORSTEHER: PROFESSOR DR. R. DOERR)

ÜBER DIE WIRKUNG DES FORMALDEHYDS AUF DIE DURCH SCHLANGENGIFTE HERVORRUFBARE KONTRAKTION DES GLATTEN MUSKELS

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der hohen medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Hans Bernkopf
aus Nürnberg

JENA
Gustav Fischer
1934

AUS DEM HYGIENISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT BASEL
(VORSTEHER: PROFESSOR DR. R. DOERR)

ÜBER DIE WIRKUNG DES FORMALDEHYDS AUF DIE DURCH SCHLANGENGIFTE HERVORRUFBARE KONTRAKTION DES GLATTEN MUSKELS

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der hohen medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Hans Bernkopf
aus Nürnberg

JENA
Gustav Fischer
1934

Von der Medizinischen Fakultät der Universität Basel genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. R. Doerr.

Tag der Promotion: 23. Juni 1934.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Abdruck aus der
Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie.
Bd. 83. 1934.
Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**

Für die Anhänger einer toxischen Pathogenese des anaphylaktischen Schocks stand das Histamin stets im Mittelpunkt der Diskussion. Daß diese Substanz aber durchaus nicht imstande ist, allen Anforderungen zu genügen, welche in dieser Hinsicht an sie gestellt werden müßten, zeigte Doerr in seinem auf der Voltatagung in Rom 1933 gehaltenen Vortrag (1). An dieser Stelle wies Doerr auch darauf hin, daß verschiedene andere Stoffe, namentlich das von Kellaway (2) näher studierte Gift der australischen Schlange „Tiger Snake", imstande sind, am isolierten Uterus des virginellen Meerschweinchens Kontraktionen hervorzurufen, die weit größere Uebereinstimmung mit der anaphylaktischen Zusammenziehung des Muskels nach Zusatz des spezifischen Antigens aufweisen als der Histamineffekt.

Unter anderem zeigt die Wirkung des australischen Schlangengifts auf den isolierten Uterus die auch der anaphylaktischen Kontraktion des präparierten Muskels eigentümliche, der Histaminreizung aber fehlende Latenzperiode. Weiter ist wie bei der anaphylaktischen Reaktion eine Desensibilisierung durch kleinste, nicht zur Kontraktion führende Giftmengen möglich und endlich spricht der Muskel ebensowenig auf wiederholten Zusatz der gleichen, anfangs wirksamen Dosis des Giftes wie auf mehrmaligen gleichgroßen Antigenzusatz an. In beiden Fällen muß die Dosis gesteigert werden, um einen wirksamen Effekt zu erzielen.

Es schien von Interesse zu sein diesen überraschenden Analogien weiter nachzugehen. Zu diesem Zweck untersuchten wir, ob die Schlangengiftwirkung durch Zugabe von Formaldehyd zu beein-

flussen sei, dessen antagonistischer Effekt auf die anaphylaktische wie die Histaminkontraktion des Meerschweinchenuterus durch die Befunde von Kendall und seinen Mitarbeitern (3, 4) bekannt ist. Setzten diese Autoren der Badeflüssigkeit, in welcher das Uterushorn suspendiert war, Formaldehyd in kleinen Mengen zu, so vermochte weder der nachträgliche Zusatz von Histamin noch die Zugabe des spezifischen, zur Injektion des sensibilisierten Tieres benutzten Antigens eine Reaktion am Muskel auszulösen.

Die ursprünglich von Kendall supponierte Spezifität dieser Reaktion für Histamin, sowie die hierfür angenommene rein chemische Wirkungsweise zwischen Histamin und Formaldehyd kann nach den Befunden von Best und Mc Henry sowie Zipf und Bartscher (5, 6) nicht aufrechterhalten werden. Diese Autoren fanden nämlich, daß Formaldehyd auch die Wirkung verschiedener anderer Reizstoffe für den glatten Muskel zu hemmen vermag und daß ferner durch Zugabe von Formaldehyd zu Histamin eine vollständige Entgiftung des Histamins, wie eine chemische Inaktivierung sie erzielen müßte, unmöglich ist.

Als wir nun in unserer eigenen Arbeit die Wirkung des Formaldehyds auf das australische Schlangengift, für dessen Ueberlassung wir auch an dieser Stelle Herrn Professor Kellaway vielmals danken, untersuchen wollten, zeigte es sich, daß wir mit weit höheren Giftkonzentrationen als Kellaway arbeiten mußten, so daß unser kleiner Vorrat an Gift schon nach wenigen Versuchen verbraucht war. Anscheinend hatte das Gift durch den Transport gelitten; denn daß nicht unsere Technik an diesem Resultat schuld war, geht daraus hervor, daß wir mit Histamin in den größten Verdünnungen stets gute Resultate erzielten. Aus diesem Grund zogen wir noch andere Schlangengifte, die uns von Herrn Professor H. Sachs, Heidelberg, und Herrn Dr. Seidenberg, Basel, in liebenswürdigster Weise zur Verfügung gestellt wurden, in den Kreis unserer Untersuchung. Dabei erhoben wir Befunde, welche es ermöglichen, den Wirkungsmechanismus des Formaldehyds, der, wie oben angedeutet, verschiedene Beurteilung erfahren hat, von einem neuen Gesichtspunkt aus zu betrachten. Dadurch hat sich unsere ursprüngliche Fragestellung, welche nur das Verhalten des Kellawayschen Giftes gegenüber Formaldehyd zum Gegenstand hatte, etwas verschoben.

Wir schildern nun im folgenden zunächst unsere Versuche über die Hemmung der Schlangengiftwirkung durch Formaldehyd und bringen dabei die wenigen Resultate, die wir mit dem

Kellawayschen Gift erhielten. Im zweiten Teil der Arbeit wird von den Befunden die Rede sein, welche uns Aussagen über den Wirkungsmechanismus des Formaldehyds ermöglichen.

Versuchsanordnung.

Meerschweinchen von einem Gewicht zwischen 200—250 g wurden durch Genickschlag getötet, beide Uterushörner sofort herausgenommen und in Ringer-Dalesche Lösung gesetzt. Für einen Versuch benutzten wir meist die beiden Hörner, indem wir an dem einen den Hemmungsvorgang untersuchten, während der andere als Kontrollstreifen mit dem Gift allein behandelt wurde. Den Muskel suspendierten wir in einem Gefäß mit Ringer-Dalescher Lösung, durch das beständig Sauerstoff perlte, in der Weise, daß das eine Ende fixiert war, während das andere mit einem Schreibhebel in Verbindung stand, welcher die Längenveränderungen des Muskels an einem rotierenden Kymographion aufzeichnete. Das Gefäß, in welchem der Uterus in dieser Weise suspendiert war, tauchte in ein größeres Wasserbad, das eine konstante Temperatur zwischen 37 und 39° C aufwies. Durch eine einfache Spülvorrichtung war es möglich, die Ringerlösung, in welche der Muskel tauchte, beliebig oft zu wechseln. Nachdem der Uterus eine Zeitlang beobachtet worden war, wurde der ihn umspülenden Flüssigkeit Formaldehyd und 2—5 Minuten später Schlangengift zugesetzt. In den Kontrollversuchen stellten wir die Reaktion des Muskels auf Gift allein fest. Formaldehyd benutzten wir in Verdünnung 1 : 10 der käuflichen 40proz. Lösung, die neutralisiert und in Mengen von 0,4 und 0,5 ccm zugesetzt wurde. Die Endkonzentrationen des Formaldehyds in dem 60 ccm fassenden Gefäß betrugen also 1 : 2000 bis 1 : 1200. Die Dosen waren somit geringer als die von Kendall angegebene, den Uterus nicht reizende Grenzdosis (Verdünnung 1 : 750). Trotzdem stellten wir öfters kleine Kontraktionen nach Zugabe dieser Dosen fest, die aber immer von selbst zurückgingen. Die Schlangengifte verwandten wir in Verdünnungen von 1 : 250 bis 1 : 100 und gebrauchten hiervon Mengen von 0,4 bis 2,5 ccm, womit hohe, aber nicht maximale Kontraktionen erreicht wurden.

1. Teil.

Hemmung der Schlangengiftwirkung durch Formaldehyd.

Im ganzen wurden zehn Versuche gemacht, davon sieben mit Kontrollen (zweites Horn kontrahiert sich auf Giftzusatz). Hierbei ergab sich zunächst, daß die mit den beiden nicht-australischen Schlangengiftarten erhaltenen Zusammenziehungen sich schon dadurch vom Typ der anaphylaktischen Kontraktion wie von der Kellawayschen Giftwirkung unterschieden, daß sie sich weder spontan lösten noch durch wiederholtes Auswaschen zum Rückgang bringen ließen. Im übrigen waren unsere Befunde folgende: sechsmal erhielten wir vollständige Hemmung der Kontraktion,

wenn wir vor dem Gift Formaldehyd zugesetzt hatten. Viermal ergab sich eine partielle Hemmung unter diesen Bedingungen, d. h. der Effekt des Giftes war bei vorherigem Formaldehydzusatz bedeutend geringer als seine ungehemmte Wirkung. Bei den beiden, in den genannten Zahlen schon mitgezählten Versuchen mit dem von Kellaway benutzten australischen Gift ergab sich das eine Mal eine totale, das andere Mal eine partielle, aber deutliche Hemmung durch Formaldehydzusatz. Soweit man aus diesen wenigen Versuchen einen Schluß ziehen darf, scheint die hemmende Formaldehydwirkung auf das australische Schlangengift also ebenso wie bei den anderen untersuchten Giften vorhanden zu sein. Damit ist eine neue Analogie des Kellawayschen Giftes zu der anaphylaktischen Reaktion, die ja ebenfalls durch Formaldehyd hemmbar ist, gezeigt.

Betrachtet man die vielfältigen übereinstimmenden Symptome der australischen Schlangengiftwirkung und der anaphylaktischen Reaktion, zu der hier nur ein kleiner Beitrag geliefert werden konnte, und die nicht einmal vollständig aufgezählt sind, so drängt sich ein Gedanke auf, den Doerr in seinem bereits mehrfach erwähnten Vortrag (1) dahingehend formuliert hat, „daß diese vielfältigen Parallelismen eine gemeinsame Ursache haben müssen". Worin diese zu suchen ist, kann freilich nur vermutet werden. Am ehesten scheint hier noch die Doerrsche Zellmembrantheorie einen Weg für das Verständnis zu eröffnen. Es wäre danach etwa anzunehmen, daß das Schlangengift ebenso wie die anaphylaktische Reaktion letzten Endes identische Veränderungen physikalisch-chemischer Natur an den Zellmembranen hervorruft.

2. Teil.

Die nachträglich auftretende Kontraktion nach dem Auswaschen.

Wir kommen nun zu den Ergebnissen, die uns die Möglichkeit verschaffen, zu der Frage nach dem Wirkungsmechanismus des Formaldehyds Stellung zu nehmen. Wir haben bereits darauf hingewiesen, daß Kendall den von ihm entdeckten Antagonismus zwischen Formaldehyd und Histamin rein chemisch erklärt wissen wollte und die Reaktion, welche zwischen diesen beiden Substanzen ablaufen sollte, sogar zu formulieren versuchte. Andere Autoren sind dagegen der Ansicht, daß neben der chemischen Bindung

noch eine „direkte intrazelluläre Wirkung auf das Zellsubstrat“ (Zipf und Bartscher) eine Rolle spiele. Unsere Befunde lassen uns von einem anderen Gesichtspunkt dieser Frage näher kommen.

Als Vorarbeit zu diesen Untersuchungen prüften wir die Kendallschen Angaben über die hemmende Wirkung des Formaldehyds auf die Histaminkontraktion des Uterusmuskels nach. Wir machten neun Versuche, in denen wir die Kendallschen Befunde vollkommen bestätigen konnten. Dabei fanden wir aber noch folgendes: wenn nach dem Ausbleiben einer Histaminwirkung infolge des vorherigen Formaldehydzusatzes die Ringerlösung gewechselt wurde, in welcher der Muskel suspendiert war, so erfolgte in sechs von den neun Versuchen nunmehr eine deutliche Kontraktion. Und zwar trat diese nie sofort ein, sondern oft erst mehrere Minuten nach dem Waschen; sie erreichte nie die Höhe der ungehemmten Histaminkontraktion, war aber stets deutlich. Auch mit den Schlangengiften erhielten wir unter diesen Bedingungen nachträglich viermal eine Kontraktion nach dem Wechsel der Badeflüssigkeit, bei im ganzen sechs Versuchen mit kompletter Hemmung. Mit dem Kellawayschen Gift erhielten wir bei der einzigen von uns beobachteten vollständigen Hemmung nachträglich beim Auswaschen nur einen leichten Tonusanstieg. Dieser löste sich wieder, ebenso wie die deutlichen Auswaschkontraktionen nach gehemmter Histaminwirkung. Die durch die beiden anderen Gifte erhaltenen Auswaschphänomene lösten sich hingegen weder spontan noch nach wiederholtem Auswaschen. Dazu muß noch einmal bemerkt werden, daß die Kontraktionen, die wir durch das Kellawaysche Gift ohne vorherigen Formaldehydzusatz beobachteten, ebenfalls von selbst zurückgingen und damit in deutlichem Gegensatz zu den beiden anderen Giftwirkungen standen, die nicht mehr lösbare Zusammenziehungen darstellten.

Wir glauben diese Ergebnisse mit dem von Berger und Mutsaars beschriebenen (7) Auswaschphänomen gleichsetzen zu dürfen, das diese Autoren allerdings unter anderen Bedingungen feststellten, nämlich bei der Hemmung der anaphylaktischen Kontraktion des Meerschweinchenuterus. Setzten Berger und Mutsaars vor der Antigenzugabe Alkohol zur Badeflüssigkeit, so erfolgte keine Zusammenziehung des Testorgans, während das Auswaschen eine deutliche Kontraktion hervorrief. Da in dem

eben geschilderten Versuch mit Sicherheit anzunehmen ist, daß der Alkohol direkt auf den Muskel wirkt, so ist die Folgerung nicht von der Hand zu weisen, daß in Anbetracht der phänomenologischen Uebereinstimmung des Auswaschphänomens bei der anaphylaktischen Versuchsanordnung und bei der Benutzung von Histamin und Schlangengift auch das Formaldehyd die Kontraktion des Muskels als solche beeinflußt. Das Auswaschphänomen dürfte dann in der Weise zustande gekommen sein, daß nach vorübergehender Hemmung der Muskelkontraktion durch Formaldehyd beim Auswaschen dasselbe entfernt wird, wonach das restierende Gift bzw. Histamin seine Wirkung entfalten kann. Die Tatsache, daß die genannten Autoren auch einige Male, allerdings nicht regelmäßig, auch bei der Histaminhemmung durch Alkohol ein Auswaschphänomen erhielten, macht unsere Annahme noch wahrscheinlicher. Für die Möglichkeit einer direkten Wirkung des Formaldehyds spricht auch die Beobachtung, daß wir oft bei bloßer Formaldehydzugabe kleine, sich stets wieder lösende Muskelkontraktionen erhielten. Die Möglichkeit, daß außerdem das Formaldehyd mit dem Gift bzw. Histamin in direkte Reaktion tritt, kann durch diese Befunde selbstverständlich nicht ausgeschlossen werden, dürfte aber wenig wahrscheinlich sein, weil die Auswaschkontraktionen mit dem Typ der reinen Gift- bzw. Histaminkurven übereinstimmten, woraus wir ableiten, daß die wirksamen Stoffe wenig oder gar nicht durch Formaldehyd verändert worden sind.

Zusammenfassung.

1) Formaldehyd hemmt bei vorherigem Zusatz die sonst durch Schlangengift hervorrufbare Kontraktion des nach der Schultz-Daleschen Methode suspendierten Uterus. Auch die durch das Kellawaysche Schlangengift bewirkte Zusammenziehung kann durch Formaldehyd ganz oder teilweise unterdrückt werden. Damit wurde eine weitere Uebereinstimmung dieses Giftes mit der anaphylaktischen Reaktion am isolierten Muskel gefunden.

2) Wurde nach gelungener Hemmung der Gift- bzw. Histaminwirkung durch Formaldehyd die Ringerlösung gewechselt, so kam es in der Mehrzahl unserer Versuche noch zu einer nachträglichen Kontraktion.

3) Die Aehnlichkeit dieser Reaktion mit dem von Berger und Mutsaar beschriebenen Auswaschphänomen wird besprochen

und die Möglichkeit diskutiert, daraus eine Theorie über den Wirkungsmechanismus des Formaldehyds abzuleiten.

Literaturangabe.

1) R. Doerr, Vortrag, Reale Accad. d. Italia, Convegno Volta 1933.
2) C. H. Kellaway, British Journ. of exper. Pathol., Vol. 10, 1925, p. 281.
3) Kendall, Alexander and Holmes, Journ. of infect. dis., Vol. 41, 1927, p. 137.
4) Kendall, Journ. of infections dis., Vol. 40, p. 689.
5) Best and Mc Henry, Journ. of Physiol., Vol. 70, p. 349.
6) Zipf und Bartscher, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmak., Bd. 171, S. 137.
7) Berger und Mutsaars, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 83, 1934, S. 1.